

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 18 日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/76630 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 39/395, 48/00,  
A61P 29/00, 19/02, 43/00, G01N 33/53

Koichiro) [JP/JP]; 〒960-8055 福島県福島市野田町  
6-10-11-201 Fukushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02981

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 6 日 (06.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-105087 2000 年 4 月 6 日 (06.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本間 好  
(HOMMA, Yoshimi) [JP/JP]; 〒960-8157 福島県福島  
市蓬萊町6-6-26 Fukushima (JP). 佐藤弘一郎 (SATO,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DIAGNOSTICS AND REMEDIES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチの診断薬および治療薬

(57) Abstract: Participation of c-erbB-2 in the proliferation of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis is clarified and the activation, expression, etc. of c-erbB-2 are inhibited. Thus, drugs usable as remedies for rheumatoid arthritis by inhibiting the proliferation of synovial cells mediated by c-erbB-2 are provided.

(57) 要約:

慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞の増殖におけるc-erbB-2の関与を明らかに  
すること、c-erbB-2の活性化または発現等を阻害することにより、c-erbB-2を介  
した滑膜細胞の増殖を抑制し慢性関節リウマチの治療薬となる薬剤を提供す  
る。

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/76630 A1

## 明 細 書

### 慢性関節リウマチの診断薬および治療薬

#### 技術分野

本発明は、c-erbB-2を介する滑膜細胞の増殖を阻害することを特徴とする慢性関節リウマチの治療薬、診断薬およびc-erbB-2を検出することからなる慢性関節リウマチの診断方法に関する。

#### 背景技術

慢性関節リウマチは組織的、慢性的、炎症疾患であり、関節の滑膜細胞の増殖と免疫反応の異常によって特徴づけられ、徐々に腱、軟骨および骨組織の崩壊を招く病気である[Ann. Rheum. Dis., 52, S39-S47 (1993)]。

慢性関節リウマチにおける滑膜細胞の増殖過剰のシグナル伝達についてはほとんど解明されていないが、増殖因子であるEGF(epidermal growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor)、FGF (fibroblast growth factor) などが滑液中に存在し、これらの増殖因子の関与が示唆されている[日本整形外科学会雑誌, 67, 859-865 (1993)、Semin. Arthritis Rheum., 21, 191-199 (1991)]。さらに、滑膜細胞におけるPDGFレセプター[Scand. J. Immunol., 27, 285-294(1988)]および病巣内T細胞のFGFレセプターの発現レベルの上昇[Arthritis Rheum., 39, 914-922 (1996)]が報告されているが、慢性関節リウマチの病組織でのEGFレセプター(以下、EGFRという)についての報告はほとんどない。

EGFRはEGFと結合しダイマーを形成して活性化することにより、細胞を増殖に導く。EGFR以外にも、EGFRと相同性を持つerbBファミリーであるc-erbB-2 (HER2またはc-neuとも呼ばれる) が、EGF存在下でEGFRとヘテロダイマーを形成し、EGFRがチロシンキナーゼとして活性化され、c-erbB-2がリン酸化を受けることが報告されている[Biochemistry, 29, 11024-11028 (1990)]。また、c-erbB-2は同じerbBファミリーのerbB-3やerbB-4ともヘテロダイマーを形成し、ヘレグリン等のニューレグリンファミリーとの結合により活性化されることも報告されている[Science, 256, 1205-1210 (1992)、Mol. Cell. Biol., 15, 5770-5776 (1995)、J. Biol. Chem., 269, 14661-14665 (1994)、Nature, 366, 473-475 (1993)]。なお、c-erbB-2と直接結合してc-erbB-2を活性化するようなりガンドは現在まで

見出されていない。

c-erbB-2は、ラット繊維芽細胞株NIH3T3に過剰に発現させることによりトランスフォームする能力を有する[Science, 237, 178-182 (1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7159-7163 (1987)]ことや、ヒト成人のさまざまな正常組織の上皮細胞においては通常低レベルでしか発現していない[Oncogene, 5, 953-962(1990)]のに対し、肺癌[Science, 235, 177-82 (1987)、Cancer Lett., 81, 137-44 (1994)、Cancer, 73, 2359-65 (1994)、Science, 229, 974-6 (1985)]、胃癌[Cancer Res., 50, 8002-9 (1990)]、卵巣癌[Science, 244, 707-12 (1989)]および膀胱癌[Pathology, 59, 46-52 (1991)]の20~30%では過剰に発現していることから、癌などの細胞の異常な増殖に参与していることが示唆されている。また、c-erbB-2に対する抗体[Mol. Cell. Biol., 9, 1165-1172 (1989)、米国特許第5677171号、特表平8-504172、Int. J. Can., 53, 401-408 (1993)、Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol., 9, 448-454 (1993)、Clin. Ther., 21, 309-318 (1999)]やc-erbB-2のダウンレギュレーションを引き起こすc-erbB-2の細胞内ドメインに対する一本鎖抗体[Gene Ther., 1, 332-337 (1994)]、アンチセンスヌクレオチド[特表平9-506770、Br. J. Can., 70, 819-125 (1994)、Int. J. Can., 72, 631-636 (1997)]が癌細胞の増殖を抑制することも報告されているが、慢性関節リウマチの滑膜細胞の増殖における関与は報告されていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞の増殖におけるc-erbB-2の関与を明らかにし、c-erbB-2の活性化または発現等を阻害することにより、c-erbB-2を介する滑膜細胞の増殖を抑制し慢性関節リウマチの治療薬となる薬剤を提供することにある。

本発明者は、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞の過剰な増殖の主要原因はc-erbB-2の活性化であるという仮説に基づき、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞上にc-erbB-2が大量に存在していることを示し、さらにc-erbB-2がEGFの添加によりリン酸化を受け活性化されることを見出した。さらに、この滑膜細胞の増殖が、チロシンキナーゼ阻害剤ゲニステインや抗c-erbB-2抗体の添加により阻害されることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の(1)~(27)に関する。

- (1) c-erbB-2の生物活性を阻害する物質を有効成分として含有する、慢性関節リウマチの治療薬。
- (2) c-erbB-2の生物活性を阻害する物質が、c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質またはc-erbB-2の発現を抑制する物質である、上記(1)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (3) c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質、c-erbB-2リガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質、c-erbB-2のダイマー化を阻害する物質およびerbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質からなる群から選ばれる少なくとも一種である、上記(2)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (4) c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2を認識する中和抗体、該抗体断片およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる少なくとも一種である、上記(2)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (5) erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはerbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、c-erbB-2アンタゴニストまたはc-erbB-2ヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストであることを特徴とする、上記(3)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (6) erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはerbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質であることを特徴とする、上記(3)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (7) c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストが、c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(5)記載の慢性関節リウマチの治療薬。
- (8) erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(6)記載の慢性関節リウマチの治療薬。

(9) erbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質またはリン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質であることを特徴とする、上記

(3) 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

(10) c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質がチロシンキナーゼ阻害剤である上記(9)記載の慢性関節リウマチの治療薬。

(11) リン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質が、c-erbB-2の細胞内領域に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(9)記載の慢性関節リウマチの治療薬。

(12) c-erbB-2の発現を抑制する物質が、c-erbB-2遺伝子に対するアンチセンスDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群より選ばれる少なくとも一種である、上記(2)記載の慢性関節リウマチの治療薬。

(13) c-erbB-2の生物活性を阻害する物質を有効成分として含有する滑膜細胞増殖阻害剤。

(14) c-erbB-2の生物活性を阻害する物質が、c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質またはc-erbB-2の発現を抑制する物質である、上記(13)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

(15) c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質、c-erbB-2リガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質、c-erbB-2のダイマー化を阻害する物質およびerbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質からなる群より選ばれる少なくとも一種である、上記(14)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

(16) c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2を認識する中和抗体、該抗体断片およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる少なくとも一種である、上記(14)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

(17) erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはerbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、c-erbB-2アンタゴニストまたはc-erbB-2ヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストであることを特徴とする、上記(15)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

- (18) erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはc-erbB-2リガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2ヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質であることを特徴とする、上記(15)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (19) c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストが、c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(17)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (20) erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(18)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (21) erbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質またはリン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質であることを特徴とする、上記(15)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (22) c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質がチロシンキナーゼ阻害剤である上記(21)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (23) リン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質が、c-erbB-2の細胞内領域に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、上記(21)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (24) c-erbB-2の発現を抑制する物質が、c-erbB-2遺伝子に対するアンチセンスDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群より選ばれる、上記(21)記載の滑膜細胞増殖阻害剤。
- (25) c-erbB-2またはc-erbB-2のmRNAもしくはcDNAと特異的に結合する物質を有効成分として含有する慢性関節リウマチの診断薬。
- (26) c-erbB-2またはc-erbB-2のmRNAもしくはcDNAに結合する物質が、c-erbB-2を認識する抗体、c-erbB-2遺伝子のDNA、該DNA断片、該DNAおよびこ

これらの相補鎖の塩基配列と一致する10～50塩基からなるオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる少なくとも一種である、上記（25）記載の慢性関節リウマチの診断薬。

（27） 上記（25）または（26）記載の診断薬を用いて滑膜細胞のc-erbB-2を検出または定量することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。

#### 1. 慢性関節リウマチの治療薬および滑膜細胞増殖抑制剤

本発明の慢性関節リウマチの治療薬または滑膜細胞増殖抑制剤としては、c-erbB-2の生物活性を阻害する物質であればいかなるものでもよい。c-erbB-2の生物活性を阻害する物質としては、c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質またはc-erbB-2の発現を抑制する物質などがあげられる。

c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質としては、erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質、erbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質、c-erbB-2のダイマー化を阻害する物質またはerbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質等があげられる。

erbBリガンドとしては、c-erbB-2の活性化を引き起こす能力を有するリガンドであればいかなるものでもよいが、c-erbB-2とヘテロレセプター、好ましくはヘテロダイマーレセプターを形成するレセプター、例えばEGFR等のerbBファミリーのレセプターと結合することにより、c-erbB-2の活性化を引き起こすリガンド、c-erbB-2と直接結合してc-erbB-2の活性化を引き起こすリガンドなどが例示される。このようなりガンドとして、具体的にはEGFまたはTGF $\alpha$ などがあげられる。

c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質として、好ましくはc-erbB-2を認識する中和抗体（以下、抗c-erbB-2中和抗体と略記する）、該抗体断片およびそれらの誘導体などがあげられる。

抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体などがあげられる。モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられる。

抗体断片としては、Fab（fragment of antigen bindingの略）、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体（single chain Fv：以下、scFvと略記する）、ジスルフィド安定化抗体（disulfide stabilized Fv;dsFv）、相補性決定領域（complementaritydetermining

region:以下、CDRと略記する)を含むペプチドなどがあげられる。

抗体または抗体断片の誘導体は、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体またはそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質または低分子の化合物などを結合させた抗体に関する。

抗c-erbB-2中和抗体としては、具体的には、Mol. Cell. Biol., 9, 1165-1172 (1989)、Int. J. Can., 53, 401-408 (1993)、Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol., 9, 448-454 (1993)等により報告された抗体、ハーセプチン(Herceptin)[Clin. Ther., 21, 309-318 (1999)]などがあげられる。

c-erbB-2を含むレセプターとは、c-erbB-2を含むレセプターであればc-erbB-2単独またはc-erbB-2ホモダイマーあるいはc-erbB-2ヘテロダイマー等、いかなるものも含まれる。c-erbB-2ヘテロダイマーレセプターは、c-erbB-2とerbBファミリーより形成される。erbBファミリーとしては、EGFR等があげられる。以下、c-erbB-2とヘテロダイマーレセプターを形成するレセプターをヘテロレセプターと称する。

erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質、erbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質としては、c-erbB-2またはヘテロレセプターに対するアンタゴニスト、erbBリガンドと結合してerbBリガンドのc-erbB-2またはヘテロレセプターへの結合を阻害する物質などがあげられる。

c-erbB-2またはヘテロレセプターに対するアンタゴニストとしては、c-erbB-2またはヘテロレセプターを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体、c-erbB-2またはヘテロレセプターにerbBリガンドと競合して結合するがレセプターを活性化する能力を有さない物質などをあげることができる。抗体断片および抗体あるいは抗体断片の誘導体は、前記と同義である。

具体的には、EGFRにEGFと競合して結合するがヘテロレセプターを活性化する能力を有さないEGF誘導体[Pathol. Res. Pract., 192, 761-767(1996)]、EGFと高次構造が類似すると考えられているジャガイモカルボキシペプチダーゼインヒビター[J. Biol. Chem., 273, 12370-12377 (1998)]、TGF- $\alpha$ と拮抗するTGF- $\alpha$ 部分ペプチド[Biochem. Biophys. Res. Commun., 129, 226-232 (1985)]、メチルフェオフォルバイド[Oncol. Res., 4, 193-200 (1992)]等をあげることができる。

erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはヘテロレセプターへ



の結合を阻害する物質としては、EGF、TGF- $\alpha$ 等のerbBリガンドを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体、EGFR等のヘテロレセプターの細胞外領域のみからなる分泌型レセプターなどがあげられる。抗体断片および抗体あるいは抗体断片の誘導体は、前記と同義である。

具体的には、EGFRの細胞外領域のみからなる分泌型のEGFR[Mol. Cell. Biol., 12, 491-498 (1992), Mol. Cell. Biol., 12, 883-893 (1992)]などがあげられる。

c-erbB-2のダイマー化を阻害する物質としては、c-erbB-2を活性化する能力を有さないc-erbB-2に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体、c-erbB-2のダイマー化に関与するc-erbB-2のアミノ酸配列の341番目以降を欠失させたc-erbB-2変異体、erbBレセプターにerbBリガンドが結合しても活性化を起こさないc-erbB-2ドミナントネガティブ変異体などがあげられる。抗体断片および抗体あるいは抗体断片の誘導体は、前記と同義である。

具体的には、c-erbB-2結合能を有し、c-erbB-2のアミノ酸配列の341番目以降を欠失させたc-erbB-2スプライシングバリエーションであるハースタチン[herstatin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 10869-10874 (1999)]、c-erbB-2細胞内ドメインのアミノ酸を欠失させたc-erbB-2変異体[Oncogene, 18, 3481-3490 (1999)、J. Biol. Chem., 274, 8900-8909 (1999)]、c-erbB-2キナーゼドメインのアミノ酸に変異を加えたc-erbB-2変異体[Oncogene, 9, 1507-1514 (1994)]などがあげられる。

erbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質としては、c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質またはリン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質があげられる。

c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質としては、チロシンリン酸化を阻害する物質であればいかなるものでもよいが、ゲニステイン (genistein) [Int. J. Oncol., 15, 525-533 (1999)]、エモジン (emodin) [Cancer Res., 55, 3890-3896 (1995)]、ゲルダナマイシン (geldanamycin) [J. Med. Chem., 38, 3806-3812 (1995)]等のチロシンキナーゼ阻害剤、チロシンフォスファターゼ、c-erbB-2のリン酸化を受けるチロシンを含む部位に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体などがあげられる。抗体断片および抗体あるいは抗体断片の誘導体は、前記と同義である。

c-erbB-2のチロシンリン酸化を阻害する物質としては、チロシンキナーゼによる細胞内蛋白質のリン酸化は細胞の様々な情報伝達に参与しているので、c-erbB-2特異的なチロシンリン酸化を阻害する物質が好ましい。c-erbB-2特異的なチロシンリン酸化を阻害する物質としては、6または7-アクリルアミド-4-アニリノキナゾリン (6 or 7-acrylamide-4-anilinoquinazoline) [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 12022-12027 (1998)]、3-フェニルインドリン-2-オン (3-phenylindolin-2-one) [J. Med. Chem., 41, 2588-2601 (1998)]、チロフォスチン (tylophostin) [J. Biol. Chem., 268, 11134-11142 (1993)]等があげられる。

リン酸化したc-erbB-2と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質としては、c-erbB-2の細胞内領域に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体などがあげられる。抗体断片および抗体あるいは抗体断片の誘導体は、前記と同義である。

c-erbB-2の発現を抑制する物質としては、c-erbB-2遺伝子に対するアンチセンスDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドおよびリボザイム、転写または翻訳を特異的に阻害する化合物などがあげられる。

c-erbB-2の発現とは、c-erbB-2遺伝子のmRNAへの転写、該mRNAからc-erbB-2蛋白質への翻訳など、すべての過程を包含する。

c-erbB-2の発現を抑制する方法としては、c-erbB-2遺伝子に対するアンチセンスDNAやアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与あるいはアンチセンスRNA発現ベクターの投与による、mRNAからc-erbB-2蛋白質への翻訳の抑制[Br. J. Cancer., 70, 819-125 (1994)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 661-667 (1994)、Int. J. Can., 72, 631-636 (1997)]、c-erbB-2遺伝子プロモーターと結合するトリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチド投与による転写の阻害[Biochemistry, 38, 619-628 (1999)、Can. Res., 56, 515-522 (1996)、Gene, 149, 123-126 (1994)]、リボザイムの投与によるc-erbB-2 mRNAの分解[J. Biol. Chem., 272, 29482-29486 (1997)]、c-erbB-2遺伝子のmRNAの転写を特異的に阻害する化合物[Brit. J. Cancer., 71, 753-757 (1995)]の投与による転写の阻害等をあげることができる。

転写を特異的に阻害する化合物は、リポーターアッセイ法[転写因子研究法 田村隆明編 羊土社 1993年、Latchman DS, Transcription Factors: A Practical

Approach, IRL Press 1993]によりスクリーニングすることができる。すなわち、c-erbB-2のプロモーター領域[Gene, 136, 361-364 (1993)、J. Biol. Chem., 265, 4389-4393 (1990)、Mol. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)]をヒト細胞から調製したゲノムDNAからPCR[Dieffenbach CW & Dveksler GS, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory 1995)]等の方法で単離し、プロモーター領域の下流に、発現の定量が容易なリポーター遺伝子を接続したユニットを含むベクターを動物細胞で発現させることにより、転写を特異的に阻害する化合物をスクリーニングすることができる。リポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子やクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等があげられる。

上記で作製したリポーター遺伝子発現細胞へ試験化合物を添加してリポーター遺伝子転写量を測定し、それと試験化合物無添加の時のリポーター遺伝子転写量とを比較して、該転写量を低下させる試験化合物を、転写を特異的に阻害する化合物として選択する。

本発明のc-erbB-2の生物活性を阻害する物質は、滑膜細胞増殖阻害作用を有し、慢性関節リウマチの治療に用いることができる。

本発明のc-erbB-2の生物活性を阻害する物質が蛋白質の場合は、該蛋白質をコードする遺伝子を含有する遺伝子治療用ベクターを作製し、該ベクターを患者に投与することにより、該蛋白質を患者の滑膜組織中に発現させ、滑膜細胞の増殖抑制や慢性関節リウマチの治療を行うことができる。

## 2. 慢性関節リウマチ治療用の医薬製剤

c-erbB-2の生物活性を阻害する物質を有効成分として含む本発明の慢性関節リウマチ治療および滑膜細胞増殖阻害のための医薬製剤は、活性成分として該物質単独で、または任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理学的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内などの非経口をあげることができる。

投与形態としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤などがある。

経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを使用して製造できる。また、錠剤、散剤および顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性物質を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体などを用いて注射用の溶液を調製する。また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

本発明の医薬製剤の投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なるが、通常経口の場合、有効成分として成人一人当たり0.01mg~1g、好ましくは0.05~50mgを一日一回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、成人一人当たり0.001~100mg、好ましくは0.01~10mgを一日一回ないし数回投与する。しかしながら、これら投与量および投与回数に関しては、前述の種々の条件により変動する。

### 3. 慢性関節リウマチ患者の診断薬

慢性関節リウマチの診断薬としては、正常人の滑膜細胞では低発現であるが慢性関節リウマチ疾患患者の滑膜細胞には高発現する蛋白質に対して特異的に結合する物質、該蛋白質のmRNAもしくはcDNAに特異的に結合する物質があげられる。これらの物質を用いて該蛋白質の検出や定量あるいは該蛋白質のmRNAの検出や定量を行うことにより、試料中の該蛋白質の発現量を測定できる。

正常人の滑膜細胞では低発現であるが慢性関節リウマチ疾患患者の滑膜細胞には高発現する蛋白質として、c-erbB-2があげられる。したがって、滑膜細胞の

c-erbB-2の定量または検出することができる物質は、慢性関節リウマチの診断薬として有用である。本発明は、滑膜細胞のc-erbB-2を定量または検出することができる物質を有効成分として含有する慢性関節リウマチの診断薬および該診断薬を用いる慢性関節リウマチの診断方法に関する。c-erbB-2を定量または検出することができる物質としては、抗c-erbB-2抗体、該抗体断片およびそれらの抗体の誘導体、c-erbB-2のmRNAを定量または検出することができるc-erbB-2遺伝子のDNA、該DNA断片、およびこれらの相補鎖の塩基配列と一致する長さ10～50塩基からなるオリゴヌクレオチドなどがあげられる。

#### 4. 慢性関節リウマチの診断方法

本発明の慢性関節リウマチの診断に用いる試料としては、被検者の関節から外科的手法等により採取した滑膜組織の生検試料を用いることができる。また、必要に応じて、Biochem. Biophys. Res. Com., 210, 1066-75 (1995)に記載の方法により上記の方法で採取した滑膜組織から分離した後に培養した滑膜細胞を試料として用いることもできる。

##### (1) c-erbB-2の発現レベルを免疫学的に測定する慢性関節リウマチの診断方法

本発明の慢性関節リウマチの診断方法としては、例えば、被験者の滑膜組織または滑膜細胞に存在するc-erbB-2を、c-erbB-2を認識する抗体、抗体断片およびそれらの抗体の誘導体を用いて、下記に述べる免疫学的に検出または定量する方法により、正常な滑膜組織または滑膜細胞での発現レベルと比較する方法があげられる。

c-erbB-2を認識する抗体、抗体断片またはそれらの抗体の誘導体を用いて滑膜組織または滑膜細胞に存在するc-erbB-2を免疫学的に検出する方法としては、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法、フローサイトメトリ、ウェスタンブロッティング法、サンドイッチELISA等の酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay; EIA) や放射性免疫測定法 (Radioimmunoassay; RIA) などがあり、文献〔富山朔二・安東民衛編 単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック 1987年)、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 (東京化学同人 1986年)、Goding JW, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Third edition (Academic Press 1996)、Harlow E & Lane D, Antibodies: A laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory 1988)〕に基づいて行うことが

できる。

免疫組織化学染色法は、被検者の関節から採取した滑膜組織の組織切片あるいはそこから分離した滑膜細胞を固定化し、c-erbB-2を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらに蛍光物質、酵素、ビオチン、金コロイド、放射性物質等で標識した抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、必要ならば標識抗体の可視化処理を行い、顕微鏡を用いて観察することにより組織や細胞中のc-erbB-2を検出する方法である。蛍光物質標識には、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミン・イソチオシアネート等が用いられ、蛍光顕微鏡によって観察することにより検出する。酵素標識の場合はペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等が用いられ、酵素により発色する基質を添加して発色反応させた後、光学顕微鏡で観察することにより検出できる。ビオチン標識の場合は、ペルオキシダーゼ等の酵素で標識したアビジンを反応させた後、酵素標識抗体と同様の操作を行う。金コロイド標識の場合は、電子顕微鏡で観察することにより検出する。放射性物質標識には<sup>125</sup>I等が用いられ、感光乳剤をコートして放射線により析出した銀粒子を光学顕微鏡で観察することにより検出できる。

フローサイトメトリーは、被検者の関節から採取した滑膜組織から分離した滑膜細胞に、c-erbB-2を認識する抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネートあるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定することにより、細胞でのc-erbB-2の発現を検出する方法である。

ウェスタンブロッティング法は、被検者の関節から採取した滑膜組織またはそこから分離した滑膜細胞あるいはそれらの破碎液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した後、該ゲルをPVDF膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜にc-erbB-2を認識する抗体またはその抗体断片を反応させ、さらにペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素や<sup>125</sup>I等の放射性物質で標識した抗イムノグロブリン抗体あるいは抗体断片を反応させた後、c-erbB-2のバンドを検出する方法である。検出は、酵素標識の場合は、酵素により発色する基質を添加して反応させc-erbB-2のバンドを可視化したり、酵素により発光する基質を添加してX線フィルムを用いたオートラジオグラフィー

により検出し、放射性物質の場合はX線フィルムを用いたオートラジオグラフィにより検出する。

酵素免疫測定法の一つであるサンドイッチELISAでは、抗原認識部位の異なる2種類のc-erbB-2を認識するモノクローナル抗体を用意し、あらかじめ一方のモノクローナル抗体または抗体断片はプレートに吸着させ、もう一方のモノクローナル抗体または抗体断片はペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素で標識しておく。被検者の関節から採取した滑膜組織あるいはそこから分離した滑膜細胞から細胞破碎液を調製し、試験サンプルとする。抗体吸着プレートに試験サンプルを反応させ、さらに酵素標識したc-erbB-2モノクローナル抗体またはその抗体断片を反応させ、酵素により発色する基質を添加して発色反応させた後、分光光度計により発色強度を測定することにより、サンプル中のc-erbB-2の検出または定量を行う。

放射性免疫測定法は、酵素のかわりに<sup>125</sup>I等の放射性物質で標識した抗体を用いて、酵素免疫測定法と同様の操作を行い、シンチレーションカウンターで放射線を測定することによりサンプル中のc-erbB-2の検出または定量を行う方法である。

また酵素免疫測定法や放射性免疫測定法には、上記のようなサンドイッチ法の他に、抗体でなくc-erbB-2標品を標識し、一定量の標識c-erbB-2標品と試験サンプルとをプレートに固相化したc-erbB-2を認識する抗体または抗体断片と反応させ、プレート上の酵素活性や放射線を測定することにより、サンプル中のc-erbB-2の検出または定量を行う競合法もある。

## (2) c-erbB-2の発現レベルをmRNAレベルで測定する診断方法

滑膜細胞におけるc-erbB-2の発現レベルの増加は、mRNAレベルで増加している可能性が高いので、c-erbB-2蛋白質でなく、c-erbB-2 mRNAの量を測定することによっても、慢性関節リウマチを診断できる。具体的には、被検者の関節から採取した滑膜組織あるいはそこから分離した滑膜細胞からRNAを調製し、c-erbB-2のmRNA特異的なRT-PCR[Dieffenbach CW & Dveksler GS, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory 1995)]あるいはノーザンブロットハイブリダイゼーションによりmRNAレベルを測定し、正常な滑膜細胞のmRNAレベルと比較することにより診断することができる。RT-PCRに用いる

プライマーはc-erbB-2のcDNAの塩基配列 (GenBankアクセス番号X03363) およびその相補鎖の塩基配列と一致する10~50塩基からなるオリゴヌクレオチドをDNA合成機により調製し、用いることができる。また、ノーザンブロットハイブリダイゼーションのプロープとして、c-erbB-2のcDNAあるいはその断片を<sup>32</sup>Pなどの放射性同位元素やジゴキシゲニン等で標識したものをを用いることができる。c-erbB-2のcDNAやその断片は、c-erbB-2の発現が報告されている細胞株、例えばMKN-7[Nature, 319, 230-234 (1986)]からRNAを調製し、RT-PCRを行うことにより調製できる。ノーザンブロットハイブリダイゼーションやRNAの調製は実験書[Sambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory 1989)]に記載の方法で行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図aは、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞でのc-erbB-2を検出を示す図である。該滑膜細胞について抗c-erbB-2抗体によるウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

第1図bは、該滑膜細胞のc-erbB-2のEGF添加によるチロシンリン酸化を示す図である。EGF添加後経時的に調製した、該滑膜細胞の抗c-erbB-2抗体による免疫沈降物についての、ウェスタンブロッティングの結果である。左側4レーンは抗c-erbB-2抗体による検出結果、右側4レーンは抗リン酸化チロシン抗体による検出結果を示す。noneはEGF添加前、数字はEGF添加後の時間(分)を示す。

第2図は、ゲニステイン添加による該滑膜細胞の増殖阻害を示す図である。棒グラフの横軸は添加したゲニステイン濃度( $\mu\text{g/ml}$ )、縦軸は590 nmの吸光度の平均値であり、細胞の増殖度を表わす。各濃度での吸光度の平均値を棒グラフの上に数字で示し、標準誤差を縦線で表わした。

第3図は、ハーセプチン添加による該滑膜細胞の増殖阻害を示す図である。横軸は添加したハーセプチン濃度( $\mu\text{g/ml}$ )、縦軸は590 nmの吸光度の平均値であり、細胞の増殖度を表わす。各濃度での吸光度の平均値を棒グラフの上に数字で示し、標準誤差を縦線で表わした。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例 1 慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞におけるc-erbB-2遺伝子の発現

##### (1) 滑膜細胞の調製



慢性関節リウマチ患者からBiochem. Biophys. Res. Com., 210, 1066-75 (1995)に記載の方法によりリウマチ患部の滑膜細胞を調製した。すなわち、慢性関節リウマチ患者から外科手術により得た滑膜細胞を細かく刻み、コラゲナーゼ(4 mg/ml)を含む培地RPMI1640中で37°Cで4時間酵素処理し、細胞をばらばらにした。得られた細胞を生育培地(10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640)中で、5%CO<sub>2</sub>条件下の加湿CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日から4日ごとに生育培地を交換しながら培養し、細胞がサブコンフルエントまで生育したら、1:2~1:4の比率で継代(細胞を回収して1/2~1/4ずつ別の培養フラスコに植え継いで新しい生育培地で培養する)した。7回から15回継代した細胞を以下の実験に供した。

## (2) ウェスタンブロットによる滑膜細胞でのc-erbB-2蛋白質の発現の検出

ほぼコンフルエント状態の滑膜細胞を、氷冷したリン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、1%ノニデットP-40を含む緩衝液〔20 mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、1 mM EDTA、50 mMフッ化ナトリウム、50 mMβ-グリセロリン酸、0.05 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、10 μg/mlロイペプチン、10 μg/mlアプロチニン、100 mM PMSF〕中で、4°Cで1時間溶解した。遠心分離後の上清(以下、細胞溶解物と称する。)について、以下の免疫沈降を行った。

細胞溶解物にマウス抗c-erbB-2抗体(カルピオケム社製)を加えて、4°Cで一晩インキュベートし、免疫複合体を形成させた。該免疫複合体にプロテインG-セファロース(50%スラリー状、ザイムド・ラボラトリーズ社製)30 μlを加えて4°Cで30分間インキュベートすることにより、該免疫複合体を結合させた。プロテインG-セファロースを回収し、0.1% Tween20を含むトリス緩衝液(pH7.6)で5回洗浄後、20 mlのSDS-PAGEサンプル用緩衝液〔62.5 mMトリス-塩酸(pH6.8)、10%グリセロール、2.3% SDS、5% 2-メルカプトエタノール〕中で90°Cで5分間加熱して、緩衝液中に免疫複合体を溶解させて、免疫沈降物を得た。該免疫沈降物について、ウェスタンブロッティングによりc-erbB-2を検出した。

免疫沈降物のSDS-PAGEを行って蛋白質を分離した後、PVDFフィルターにブロッティングし蛋白質を転写した。5%脱脂粉乳を含むトリス緩衝液を用いてフィルターの非特異的結合をブロックした後、該フィルターにマウス抗c-erbB-2抗体(カルピオケム社製)を反応させた。反応後、該フィルターに、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgG抗体〔ダコ(Dako)社製〕を

反応させた後、化学発光に基づく検出系ECL（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）を用いてバンドを検出した。

第1図aにウエスタンブロッティングの結果を示したが、c-erbB-2抗体と反応する、185 kDaの強いバンドが検出された。この分子量は細胞上のc-erbB-2の分子量の報告と一致しており、c-erbB-2が慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞で大量に発現していることが示された。

### （3）EGFによるc-erbB-2のリン酸化

細胞上にc-erbB-2とEGFRが共存している場合、EGFの添加によりc-erbB-2とEGFRはヘテロダイマー化し活性化されるため、c-erbB-2の細胞内ドメインのチロシン残基はリン酸化を受ける。そこで、（1）で調製した滑膜細胞にEGFを添加した時のc-erbB-2のリン酸化の度合いを、以下の方法により経時的に調べた。

20  $\mu$ g/mlのEGF添加後5分、10分および20分後の滑膜細胞を回収し、（2）と同様に、抗c-erbB-2抗体を用いた免疫沈降を行った。取得した免疫沈降物にSDS-PAGE（7.5%アクリルアミド）を行った後（2）と同様にして、1次抗体として抗c-erbB-2抗体および抗リン酸化チロシン抗体である4G10（アップステート・バイオテクノロジー社製）を用いてウエスタンブロッティングを行いバンドを検出した。その結果を第1図bに示した。

抗c-erbB-2抗体と反応するc-erbB-2の蛋白質量は、ほとんど変化していないのに対し、抗リン酸化チロシン抗体と反応するリン酸化を受けたc-erbB-2は時間とともに増加していた。したがって、滑膜細胞のc-erbB-2はEGFにより活性化されリン酸化を受けることが確認された。なお、EGF無添加の滑膜細胞においてもチロシンリン酸化されたc-erbB-2のバンドが検出される。したがって、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞では、滑膜細胞自身がEGF等のリガンドを分泌し、自己のc-erbB-2をある程度活性化していると考えられた。

### （4）免疫組織染色による慢性関節リウマチ患者の滑膜組織でのc-erbB-2の検出

慢性関節リウマチ患者および対照用として健常なラットの足首から外科手術により滑膜組織を取得した。滑膜組織を4%パラホルムアルデヒドを含む緩衝液中で固定した後、パラフィン中に包埋し、4  $\mu$ m厚の切片を作製した。免疫反応性を上昇させるため、切片をスライド上で、0.1%トリプシン（ザイムド・ラボラトリーズ社製）で37°C、10分間処理した。洗浄処理後、0.3%過酸化水素を

含むメタノール中で室温で30分間インキュベートし、内在するペルオキシダーゼ活性を阻害した。3%正常ヤギ血清〔ベクター・ラボラトリーズ社製 (Vector Laboratories Inc.)〕/PBS溶液で室温で1時間処理し、非特異的結合部をブロックした。次いで加湿チャンバー内で、1次抗体として2.5mg/mlマウス抗c-erbB-2モノクローナル抗体（カルビオケム社製）を室温で24時間インキュベートを行い、2次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG抗体（ベクター・ラボラトリーズ社製）を室温で1時間インキュベートした。さらにペルオキシダーゼ標識アビジンを含むアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体反応試薬を室温で1時間インキュベートした。完全に洗浄した後、DAB〔3,3'-ジアミノベンジジン4塩酸 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)、和光純薬社製〕溶液と室温で10分間インキュベートした後、3%過酸化水素添加したDAB溶液により茶色の発色反応を惹起させ、茶色が黒色に変わる前に緩衝液中で洗浄し、反応を停止させた。また、同様にして調製した組織切片に対し、メチル・グリーン（和光純薬社製）を用いて細胞の核を染色した。これらの染色組織切片はカナダバルサム（和光純薬社製）を用いてスライド作製し、光学顕微鏡で観察した。

その結果、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織は、健常ラット足首の滑膜組織よりも抗c-erbB-2抗体による染色が強く観察された。また、核染色により慢性関節リウマチ患者の滑膜組織では多くの炎症滲出細胞が観察された。

#### 実施例2. c-erbB-2のリン酸化阻害による滑膜細胞の増殖抑制

滑膜細胞で発現しているc-erbB-2が滑膜細胞の増殖に関与していることを、以下のc-erbB-2のリン酸化阻害により調べた。滑膜細胞の生育はMTT〔3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide〕を用いたアッセイ法[J. Immunol. Methods, 65, 55-63 (1983)]により測定した。

##### (1) チロシンキナーゼ阻害剤ゲニステインによる増殖阻害

実施例1と同様にして調製した慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞を96穴マイクロプレートに $5 \times 10^3$ 個/穴となるように播き、生育培地で37℃で一晩、前培養した。プレートに接着した細胞を洗浄後、チロシンキナーゼ阻害剤ゲニステインを1.5、3、6、12.5、25  $\mu$ g/mlの濃度でそれぞれ添加した生育培地、および対照としてゲニステイン非添加RPMI1640培地〔0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)添加、血清無添加〕200  $\mu$ lを用いて、2日ごとに培地を交換しながら37℃で

7日間培養した。培養最終日に5 mg/ml MTT溶液10 $\mu$ lを加えて2時間培養後、ジメチルスルホキシド100 $\mu$ lを添加してフォルマザン複合体を溶解させ、96ウェル・マルチスキャナーImmno-Mini（日本インターメッド社製）で測定した波長590 nmの吸光度を細胞の増殖度とした。計4回、同様の実験を行い、平均値および標準誤差（SE）を求めた。

結果を第2図に示したが、ゲニステインの濃度依存的に滑膜細胞の増殖が抑制され、滑膜細胞の増殖にc-erbB-2のチロシンリン酸化が関与していることが示唆された。

## （2）抗c-erbB-2抗体による増殖阻害

ゲニステインは、チロシンキナーゼ全般を阻害する薬剤であり、c-erbB-2の自己リン酸化のみを阻害する薬剤ではない。そこで、c-erbB-2の活性化を特異的に阻害すると考えられる抗c-erbB-2モノクローナル抗体であるハーセプチン〔ジェネンテック社（Genetech Inc.）製〕の滑膜細胞の増殖に対する作用を（1）と同様にして調べた。添加するハーセプチンの濃度は0.01、0.1、1 $\mu$ g/mlで行い、対照としてはハーセプチン非添加RPMI1640培地（0.1% BSA添加、血清無添加）を用いた。第3図に結果を示したが、ハーセプチンの濃度依存的に滑膜細胞の増殖が抑制され、滑膜細胞の増殖はc-erbB-2に依存的であることが示された。

また、（1）および（2）の結果より、抗c-erbB-2抗体やチロシンキナーゼ阻害剤等、c-erbB-2の活性化あるいはチロシンリン酸化を抑制する薬剤は、滑膜細胞の増殖を抑制することができることが明らかになった。

## 産業上の利用可能性

本発明により、c-erbB-2を介した滑膜細胞の増殖を阻害することを特徴とする慢性関節リウマチの治療薬が提供される。

## 請求の範囲

1. c-erbB-2の生物活性を阻害する物質を有効成分として含有する、慢性関節リウマチの治療薬。
2. c-erbB-2の生物活性を阻害する物質が、c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質またはc-erbB-2の発現を抑制する物質である、請求項1記載の慢性関節リウマチの治療薬。
3. c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質、c-erbB-2リガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質、c-erbB-2のダイマー化を阻害する物質およびerbBリガンドがc-erbB-2に結合した後の情報伝達を阻害する物質からなる群から選ばれる少なくとも一種である、請求項2記載の慢性関節リウマチの治療薬。
4. c-erbB-2を介する情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2を認識する中和抗体、該抗体断片およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項2記載の慢性関節リウマチの治療薬。
5. erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはerbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、c-erbB-2アンタゴニストまたはc-erbB-2ヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストであることを特徴とする、請求項3記載の慢性関節リウマチの治療薬。
6. erbBリガンドのc-erbB-2への結合を阻害する物質またはerbBリガンドのc-erbB-2を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質であることを特徴とする、請求項3記載の慢性関節リウマチの治療薬。
7. c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストが、c-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、請求項5記載の慢性関節リウマチの治療薬。
8. erbBリガンドと結合して、erbBリガンドのc-erbB-2またはc-erbB-2とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質が、erbBリガンドを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とす

る、請求項 6 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

9. erbB リガンドが c-erbB-2 に結合した後の情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2 のチロシンリン酸化を阻害する物質またはリン酸化した c-erbB-2 と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質であることを特徴とする、請求項 3 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

10. c-erbB-2 のチロシンリン酸化を阻害する物質がチロシンキナーゼ阻害剤である請求項 9 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

11. リン酸化した c-erbB-2 と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質が、c-erbB-2 の細胞内領域に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、請求項 9 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

12. c-erbB-2 の発現を抑制する物質が、c-erbB-2 遺伝子に対するアンチセンス DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項 2 記載の慢性関節リウマチの治療薬。

13. c-erbB-2 の生物活性を阻害する物質を有効成分として含有する滑膜細胞増殖阻害剤。

14. c-erbB-2 の生物活性を阻害する物質が、c-erbB-2 を介する情報伝達を阻害する物質または c-erbB-2 の発現を抑制する物質である、請求項 13 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

15. c-erbB-2 を介する情報伝達を阻害する物質が、erbB リガンドの c-erbB-2 への結合を阻害する物質、c-erbB-2 リガンドの c-erbB-2 を含むレセプターへの結合を阻害する物質、c-erbB-2 のダイマー化を阻害する物質および erbB リガンドが c-erbB-2 に結合した後の情報伝達を阻害する物質からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項 14 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

16. c-erbB-2 を介する情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2 を認識する中和抗体、該抗体断片およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項 14 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

17. erbB リガンドの c-erbB-2 への結合を阻害する物質または erbB リガンドの c-erbB-2 を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、c-erbB-2 アンタゴニストまたは c-erbB-2 ヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニスト

トであることを特徴とする、請求項 15 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

18. erbB リガンドの c-erbB-2 への結合を阻害する物質または c-erbB-2 リガンドの c-erbB-2 を含むレセプターへの結合を阻害する物質が、erbB リガンドと結合して、erbB リガンドの c-erbB-2 または c-erbB-2 ヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質であることを特徴とする、請求項 15 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

19. c-erbB-2 または c-erbB-2 とヘテロレセプターを形成するレセプターに対するアンタゴニストが、c-erbB-2 または c-erbB-2 とヘテロレセプターを形成するレセプターを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、請求項 17 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

20. erbB リガンドと結合して、erbB リガンドの c-erbB-2 または c-erbB-2 とヘテロレセプターを形成するレセプターへの結合を阻害する物質が、erbB リガンドを認識する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、請求項 18 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

21. erbB リガンドが c-erbB-2 に結合した後の情報伝達を阻害する物質が、c-erbB-2 のチロシンリン酸化を阻害する物質またはリン酸化した c-erbB-2 と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質であることを特徴とする、請求項 15 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

22. c-erbB-2 のチロシンリン酸化を阻害する物質がチロシンキナーゼ阻害剤である請求項 21 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

23. リン酸化した c-erbB-2 と細胞内情報伝達分子との相互作用を阻害する物質が、c-erbB-2 の細胞内領域に対する抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体であることを特徴とする、請求項 21 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

24. c-erbB-2 の発現を抑制する物質が、c-erbB-2 遺伝子に対するアンチセンス DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群より選ばれる、請求項 21 記載の滑膜細胞増殖阻害剤。

25. c-erbB-2 または c-erbB-2 の mRNA もしくは cDNA と特異的に結合する物質を有効成分として含有する慢性関節リウマチの診断薬。

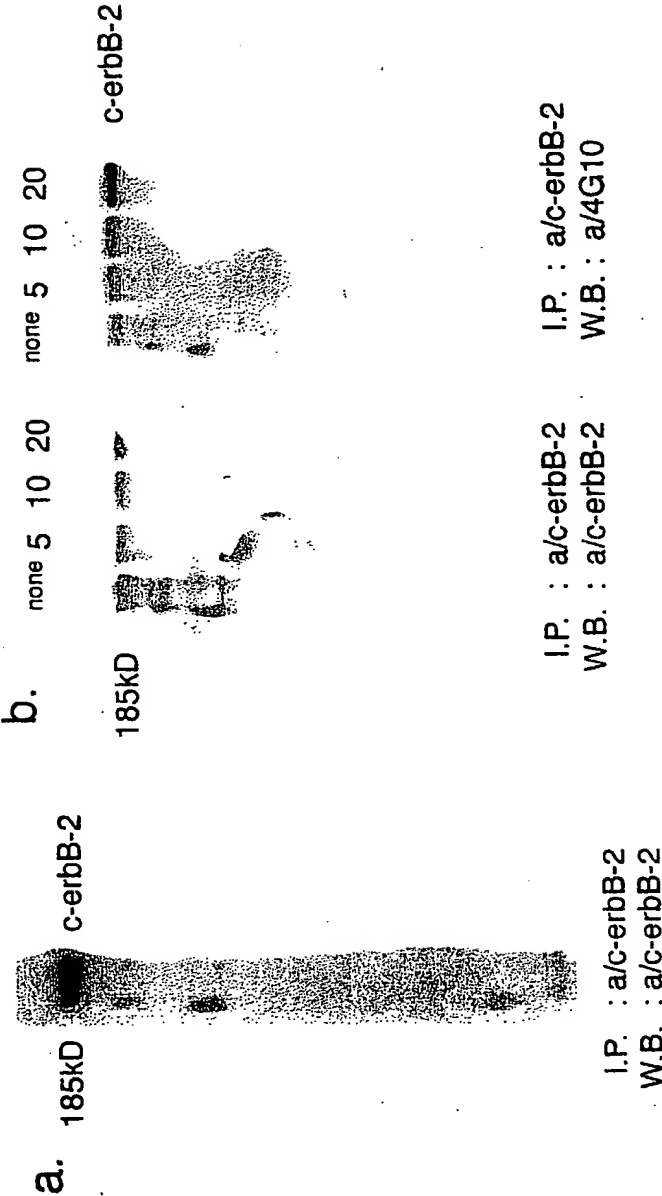
26. c-erbB-2 または c-erbB-2 の mRNA もしくは cDNA に結合する物質が、c-erb

B-2を認識する抗体、 c-erbB-2遺伝子のDNA、該DNA断片、該DNAおよびこれらの相補鎖の塩基配列と一致する10～50塩基からなるオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項25記載の慢性関節リウマチの診断薬。

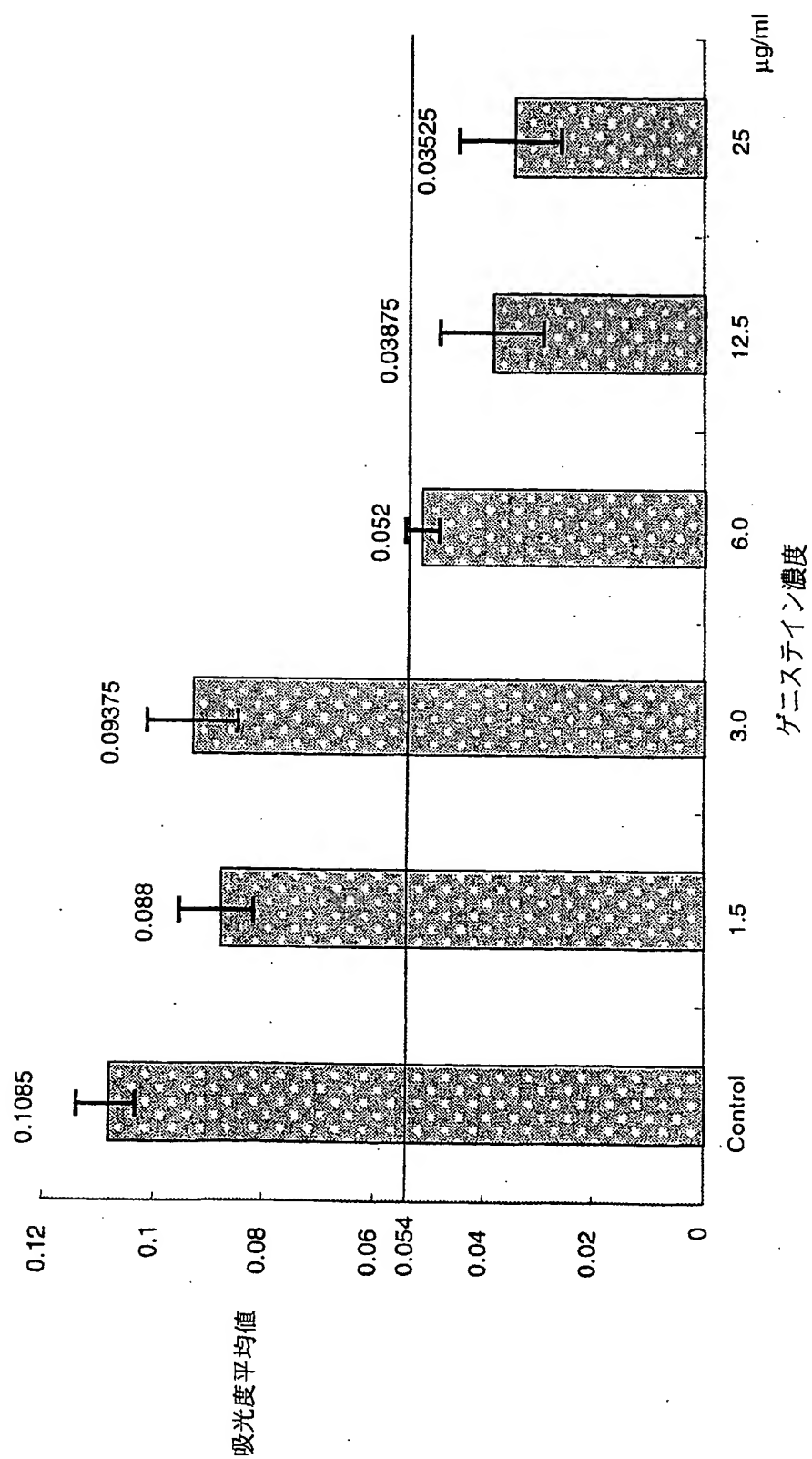
27. 請求項25または26記載の診断薬を用いて滑膜細胞のc-erbB-2を検出または定量することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。



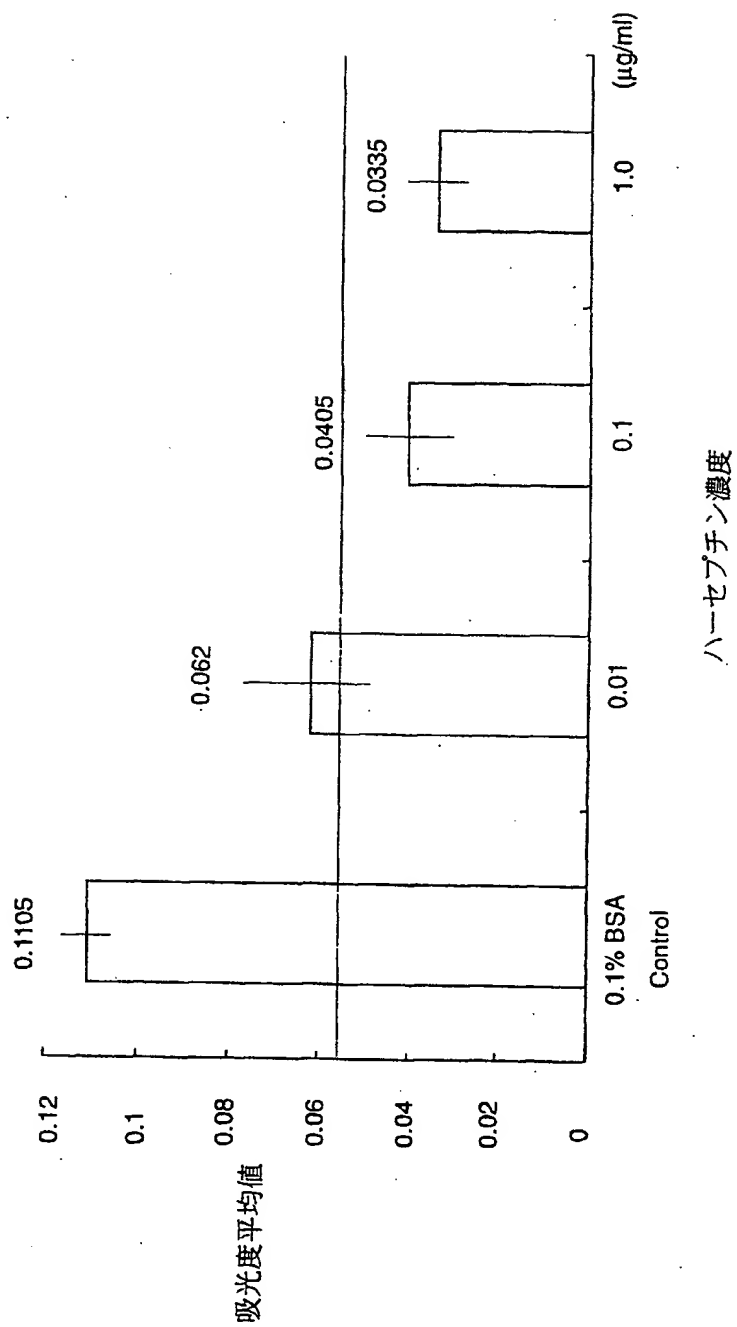
第 1 図



第2図



## 第3図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02981

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, 48/00, A61P29/00, 19/02, 43/00, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, 48/00, A61P29/00, 19/02, 43/00, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Database CAPLUS on STN, Chemical Abstracts Service, (Colimbus, OH, USA), Accession No.2001:234368, SATOH, Koichiro et al., Involvement of ErbB-2 in rheumatoid synovial cell growth., Arthritis Rheum. 2001, 44(2), 260-265	1-26
A	WO 00/017339 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 30 March 2000 (30.03.00) & AU 9956527 A1	1-26
A	WO 94/01136 A1 (Molecular Oncology Inc.) 06 January 1994 (06.01.94) & EP 655924 A1 & JP 8-504172 A & AU 9337733 A1 & AU 687346 B2 & FI 9401572 A	1-26
A	WO 95/17507 A1 (Biognostic Gesellschaft Für Biomolekulare Diagnostic MBH) 29 June 1995 (29.06.95) & EP 736093 A1 & JP 9-506770 A & AU 9513130 A	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"J" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 July, 2001 (03.07.01)

Date of mailing of the international search report  
24 July, 2001 (24.07.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02981

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/09294 A1 (The Wellcome Foundation Limited) 28 March 1996 (28.03.96) & EP 782570 A1 & JP 10-505600 A & AU 9534824 A1 & ZA 9507853 A	1-26
A	WO 97/03069 A1 (Graxo Group Limited) 30 January, 1997 (30.01.97) & EP 843671 A1 & JP 11-508906 A & AU 9666139 A1	1-26
A	WO 97/13771 A1 (Graxo Group Limited) 17 April, 1997 (17.04.97) & EP 861253 A1 & JP 11-513398 A & US 6169091 B1 & AU 9672896 A1	1-26
A	WO 95/19171 A1 (Cell Therapeutics, Inc.) 20 July 1995 (20.07.95) & EP 739203 A1 & US 5795898 A & US 5859018 A & US 5929081 A & CA 2192470 AA & AU 9518313 A1	1-26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02981

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 27 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K45/00, 39/395, 48/00, A61P29/00, 19/02, 43/00, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K45/00, 39/395, 48/00, A61P29/00, 19/02, 43/00, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Database CAPLUS on STN, Chemical Abstracts Service, (Columbus, OH, USA), Accession No.2001:234368, SATOH, Koichiro et al, Involvement of ErbB-2 in rheumatoid synovial cell growth., Arthritis Rheum. 2001, 44(2), 260-265	1-26
A	WO 00/017339 A1(協和醗酵工業株式会社) 30. 3月. 2000 (30.03.00) & AU 9956527 A1	1-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 07. 01

国際調査報告の発送日

24.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一



4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 94/00136 A1(MOLECULAR ONCOLOGY INC.)6. 1月. 1994(06.01.94) & EP 655924 A1 & JP 8-504172 A & AU 9337733 A1 & AU 687346 B2 & FI 9401572 A	1-26
A	WO 95/17507 A1(BIOGNOSTIC GESELLSCHAFT FÜR BIOMOLEKULARE DIAGNOSTIC MBH) 29. 6月. 1995 (29.06.95) & EP 736093 A1 & JP 9-506770 A & AU 9513130 A1	1-26
A	WO 96/09294 A1(THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 28. 3月. 1996(28.03.96) & EP 782570 A1 & JP 10-505600 A & AU 9534824 & A1 ZA 9507853 A	1-26
A	WO 97/03069 A1(GRAXO GROUP LIMITED) 30. 1月. 1997(30.01.97) & EP 843671 A1 & JP 11-508906 A & AU 9666139 A1	1-26
A	WO 97/13771 A1(GRAXO GROUP LIMITED) 17. 4月. 1997(17.04.97) & EP 861253 A1 & JP 11-513398 A & US 6169091 B1& AU 9672896 A1	1-26
A	WO 95/19171 A1(CELL THERAPEUTICS, INC.)20. 7月. 1995(20.07.95) & EP 739203 A1 & US 5795898 A & US 5859018 A & US 5929081 A & CA 2192470 AA & AU 9518313 A1	1-26



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲27は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**